



TITLE:

アンドロゲン依存性癌細胞増殖における細胞周期制御因子の役割

AUTHOR(S):

橋本, 良博; 秋田, 英俊; 飯塚, 敦彦; 日比野, 充伸; 郡, 健二郎

CITATION:

橋本, 良博 ...[et al]. アンドロゲン依存性癌細胞増殖における細胞周期制御因子の役割. 泌尿器科紀要 2000, 46(10): 763-767

ISSUE DATE:

2000-10

URL:

<http://hdl.handle.net/2433/114374>

RIGHT:

アンドロゲン依存性癌細胞増殖における 細胞周期制御因子の役割

名古屋市立大学医学部泌尿器科学教室 (主任 : 郡 健二郎教授)

橋本 良博, 秋田 英俊, 飯塚 敦彦

日比野充伸, 郡 健二郎

CLINICAL ROLE OF CELL CYCLE REGULATORS IN ANDROGEN-DEPENDENT CANCER CELL GROWTH

Yoshihiro HASHIMOTO, Hidetoshi AKITA, Atsuhiko IIZUKA,
Mitsunobu HIBINO and Kenjiro KOHRI

From the Department of Urology, Nagoya City University, Medical School

The functional and quantitative alterations in cell cycle regulators after androgen depletion in an androgen-dependent cancer cell and the interaction between androgen receptor and cell cycle regulators were examined in order to clarify the initial response of cancer cells to anti-androgen therapy. Fluorescence activated cell sorter analysis (FACS) of androgen-dependent cancer cell line (SC-3) cells cultured with or without 1 nM dihydrotestosterone (DHT) revealed that suppression of cell growth after androgen withdrawal was due to G1 arrest. The protein level of cyclin D1 decreased without any apparent change in the amounts of Cdk2, Cdk4, cyclin E or cyclin A. Among various Cdk inhibitors (CKIs) examined, p27 was upregulated at both mRNA and protein levels 24h after androgen depletion. On the other hand, cyclin E has been shown to increase the transactivation activity of the human androgen receptor (AR) in the presence of DHT. These results suggest that cell cycle regulators are critical targets in the initial response of androgen-dependent cancer cells to androgen depletion and play a key role in the transcriptional activity of AR.

(Acta Urol. Jpn. 46 : 763-767, 2000)

Key words: Cell cycle regulators, Androgen, Prostate cancer, Androgen receptor, Hormone therapy

緒 言

前立腺癌のアンドロゲン依存性増殖は核内レセプタースーパーファミリーに属するアンドロゲンレセプターを介した転写調節を受けている。前立腺癌がアンドロゲン依存性に増殖し、アンチアンドロゲン剤の投与が有効であることは良く知られているが、その分子メカニズムは十分解明されていないのが現状である。核内レセプターを介した転写活性化による増殖シグナルは最終的には細胞周期に影響を与えることから、最近では核内レセプターと細胞周期制御因子との関係が注目されている。今回前立腺癌のアンドロゲン依存性増殖における細胞周期制御因子の変化を調べるために¹⁾、アンドロゲン依存性癌細胞 (SC-3) を用いて、アンドロゲン除去後における細胞周期制御因子の変化²⁾、細胞周期制御因子のアンドロゲン受容体を介した転写調節をそれぞれ検討した。

対 象 と 方 法

[Antibodies]

用いた抗体はヒトサイクリン D1, ラットサイクリン E, マウスサイクリン A, ヒト Cdk2, ヒト Cdk4, マウス p27 ポリクローナル抗体で Santa Cruz 社からそれぞれ購入した。

[Cell culture]

SC-3 細胞はチャコール処理された 2 % ウシ血清と 10 nM DHT を含んだ MEM 培養液 (Gibco BRL, Life Technologies, Inc.) で維持された。実験前日に SC-3 細胞を $2 \times 10^3 / \text{cm}^2$ で継代し、翌日 0.1 % のウシ血清アルブミン (Sigma Chemical Co.) と 1 nM DHT を含んだ DMEM/F12 培養液 (Gibco BRL, Life Technologies, Inc.) に変え、更に翌日を 0 日とし、1 nM の DHT 添加または非添加した血清を含まない DMEM/F12 培養液はそれぞれ置き換え実験に用いた。細胞はトリパンブルー液で染色し、カウントした。

[Cell cycle analysis]

1 nM の DHT 存在, 非存在下で培養された SC-3 細胞を PBS で洗浄し, 2 mM EDTA (Sigma Chemical Co.) を含む PBS で10分処理した. セルスクレイパーで細胞を回収後, 0.25% のパラホルムアルデヒド (Sigma Chemical Co.) で固定し, 0.2% Tween 20 を含む PBS に 100 μ g の RNase A (Sigma Chemical Co.) を加えインキュベートした. 細胞を 50 μ g/ml の propidium iodide (Sigma Chemical Co.) で染色し, 細胞周期の解析には FACS フローサイトメーター (Becton Dickinson) を用いた.

[Western blot analysis]

細胞抽出液を10%の SDS ポリアクリルアミドゲルに展開し, ニトロセルロースメンブレン (Amersham) にトランスファーした. 一次抗体に上記抗体を用い, ECL kit (Amersham) にて発色させた.

[Northern blot analysis]

SC-3 からの RNA の抽出には RNA isolation reagent (Isogen, Nippon Gene Co.) を用いた. 各 20 μ g の総 RNA を処理し, 1% アガロースフォルムアルデヒドゲルに展開後, ナイロンメンブレンにトランスファーした. p27, p21 のプローブはマルチプライム DNA ラベリングシステム (Amersham) を用い [α - 32 P] dCTP (222 Tbq/mmol) でラベルした. ハイブリダイゼーションは50%ホルムアミドで 42°C, 24 時間施行した.

[CAT Assay]

発現ベクターとして pcDNA₃-cyclinA, pcDNA₃-cyclinD1, pcDNA₃-cyclinE, pcDNA₃- β galactosidase, pSG5-AR, ARE-CAT reporter plasmid を用い, トランスフェクションはリン酸カルシウム法で行い, 効率を上げるために細胞はヒト不死化線維芽細胞 (MDAH041) を用いた. トランスフェクション後18時間で細胞を抽出し, アッセイに用いた. トランスフェクションの効率は β -galactosidase の活性値で調整した.

結 果

[テストステロン非存在下における細胞増殖抑制と細胞周期の変化]

SC-3 細胞を DHT (1 nM) を含む培地 (黒丸), 含まない培地 (白丸) を用いて培養し, 経時的に細胞数の変化を測定した (Fig. 1). SC-3 細胞は DHT を含む培地中では指数関数的な増殖を示したが, DHT を含まない培地中では著しく増殖が抑制された. また, 培養開始後72時間以降では DHT 添加群と非添加群の細胞数に有意差が認められた.

さらに, DHT 非存在下における SC-3 細胞の増殖

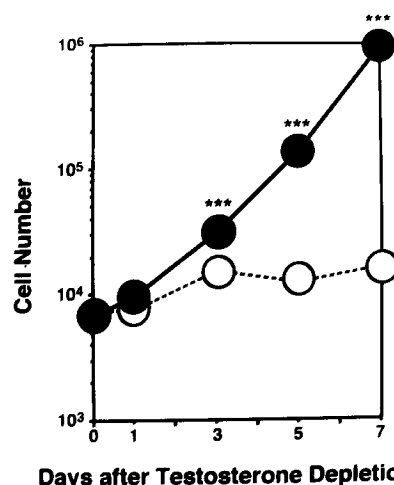


Fig. 1. Growth suppression after androgen depletion in SC-3 cells. Data are shown as means of triplicate determinations. No error bars are shown because variation is too low to depict. ***; $p < 0.005$ vs. cells without DHT at the same time points (by Student's t test).

抑制のメカニズムを明らかにするため, SC-3 細胞を DHT を含む培地, 含まない培地を用いて培養し, 経時的に細胞周期変化を FACS により検討した (Fig. 2). DHT を含まない培地で培養開始後24時間より G0/G1 期の細胞の増加, S 期の細胞の減少が認められた. 72時間の培養により G0/G1 期の細胞は43%から69%に増加し, S 期の細胞は46%から13%に減少した. したがって, DHT 非存在下における SC-3 細胞の増殖抑制は, 細胞周期の G1 期での停止によるものと考えられた.

[テストステロン非存在下におけるサイクリンとサイクリン依存性キナーゼ (Cdk) の発現の変化]

細胞周期の G1 期から S 期への進行にはサイクリン A, D1, E と Cdk2, 4 の発現変化が重要であり, 同じホルモン依存性癌である乳癌ではサイクリン D1 と Cdk4 の発現が重要であることは既に報告されている⁹⁾ DHT 非存在下における SC-3 細胞の G1 期での停止に正の細胞周期制御因子サイクリン A, D1, E と Cdk2, 4 などの発現変化が関与しているか否かを検討した.

各種サイクリン, Cdk の蛋白量の変化をウエスタンブロット法により調べた. Cdk2, Cdk4 の発現は DHT の有無により変化が認められなかったが, サイクリン A, D1 の発現は DHT 非存在下で低下した. また, サイクリン E の発現量はほとんど変化しなかった (Fig. 3).

しかしながら, DHT 非存在下における細胞周期の停止は培養開始後24時間より明らかになるのに対し, サイクリン A, D1 の発現の低下は48時間以降でのみ認められた. 次に, サイクリン, Cdk に結合するこ

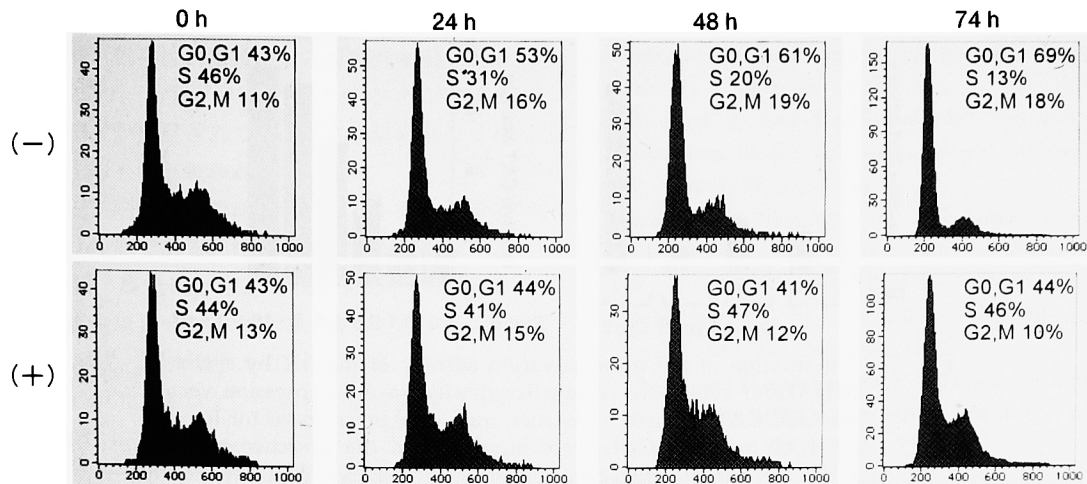


Fig. 2. G1 arrest following androgen depletion in SC-3 cells. After being cultured in the absence (-) or presence (+) of 1 nM DHT for the indicated times, SC-3 cells were treated with propidium iodide and analyzed for cell cycle distribution by FACS. Percentages of cells in the G0/G1, S, and G2/M phases of the cell cycle are shown.

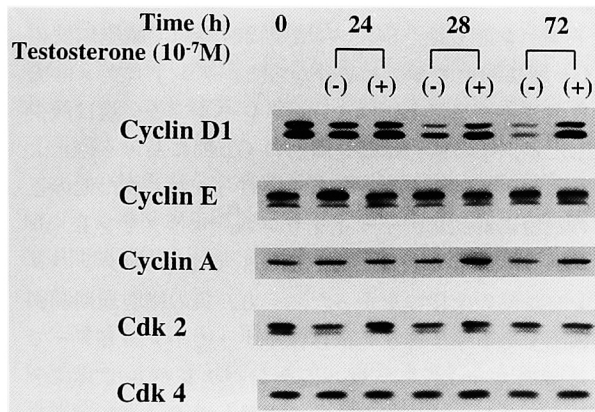


Fig. 3. The amounts of G1 cyclin and Cdk proteins after androgen depletion in SC-3 cells. The proteins of cyclin A, cyclin D1, cyclin E, Cdk2 and Cdk4 were quantitated by Western blot analyses using specific antibodies.

によりその活性を阻害する, 負の細胞周期制御因子 p21, p27 などの Cdk インヒビターの関与を検討した。

[アンドロゲン非存在下における Cdk インヒビターの関与]

Cdk2 と複合体を形成することによりその活性を阻害する Cdk インヒビター, p21, p27 のテストステロン非存在下における mRNA, 蛋白の発現をノザンブロット法, ウェスタンブロット法を用いて調べた。

p27 mRNA の発現は DHT 非存在下で培養開始後 24 時間より増加し, p21 mRNA の発現は DHT 非存在下で逆に減少した (Fig. 4A)。

p27 の蛋白量は mRNA と同様 DHT 非存在下で培養開始後 24 時間より増加した (Fig. 4B)。しかし, p21 蛋白は検出できなかった。

以上より, テストステロン非存在下で誘導される

p27 がおもにサイクリン/Cdk 複合体に結合し, Cdk の活性を低下させることにより細胞周期を G1 期に停止させていると考えられた。

[アンドロゲン受容体の転写調節における細胞周期制御因子の関与]

アンドロゲン存在, 非存在下におけるアンドロゲン受容体の転写活性に正の細胞周期制御因子サイクリン A, D1, E が関与しているか否かを CAT アッセイを用いて検討した。

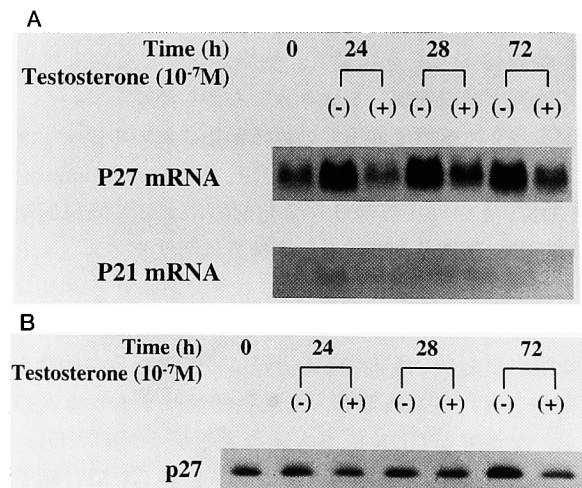


Fig. 4. Induction of p27 and its association with Cdk2 complex following androgen depletion in SC-3 cells. A. After being cultured in the absence (-) or presence (+) of 1 nM DHT for the indicated times, total cellular RNA was prepared, and the levels of p27 and p21 mRNA were determined by Northern blot analyses. B. Cell lysates were prepared, and the amounts of p27 protein were quantitated by Western blot analyses.

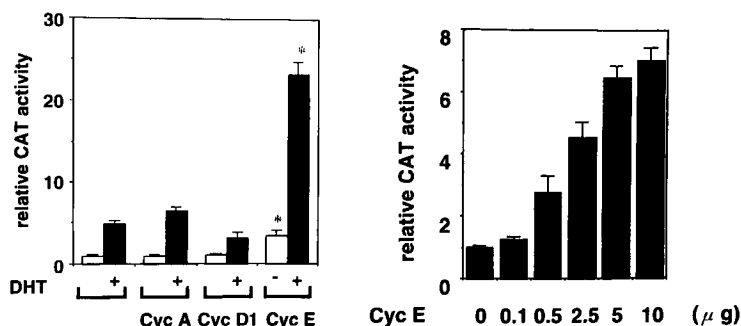


Fig. 5. Potentiation of the transactivation activity of the AR by cyclin E. MDAH041 cells were cotransfected with an AR expression vector, an ARE-CAT reporter construct, and an expression vector for cyclin E, A or D1. Cells were incubated in the presence of 1 nM DHT for 18h and then assayed for CAT activity. Data at the top are expressed as relative CAT activity and are means (SD of triplicates from a representative experiment).

サイクリンEはDHT存在、非存在下でアンドロゲン受容体の転写を活性化したが、サイクリンD1は逆に抑制した。また、サイクリンEは濃度依存性にアンドロゲン受容体の転写を活性化した (Fig. 5)。

考 察

前立腺癌のアンドロゲン依存性増殖は核内レセプタースーパーファミリーに属するアンドロゲンレセプターを介した転写調節を受けているが、その分子メカニズムは十分解明されていない。核内レセプターを介した転写活性化による増殖シグナルは最終的には細胞周期に影響を与えることから、最近では核内レセプターと細胞周期制御との関連が注目されている¹⁾

細胞はDNAを複製し、細胞が2つに分裂していく過程(細胞周期)を繰り返しながら増殖していく。酵母からヒトに至るまでの真核動物においてはサイクリン依存性キナーゼ(cyclin dependent kinase: CDK)という一群のリン酸化酵素によって細胞周期は巧妙に制御されている。本酵素は活性サブユニットであるCDKと調節サブユニットであるサイクリンの複合体である。これらのCDKは何種類かの重要な蛋白質をリン酸化することによってそれらの活性を変化させ、その結果として細胞増殖サイクルを進める。なかでもCDK4, 6と結合するサイクリンD1, CDK2と結合するサイクリンA, EがG1期に働くサイクリンとして重要である²⁾ 細胞周期の進行には、数種のCDKの活性化が必要であり、そのCDKの阻害活性を持つ一連の蛋白質が、サイクリン依存性キナーゼインヒビター(Cdk inhibitors: CKI)であり、p21, p27, p57 (Cip/Kipファミリー)とp15, p16, p18, p19 (INK4ファミリー)から成る³⁾

本研究は、前立腺癌ホルモン療法時の癌細胞増殖抑制のメカニズムを調べるために、シオノギ癌細胞株⁴⁾より確立したアンドロゲン依存性癌細胞(SC-3)⁵⁾を

用いて、アンドロゲン除去後の変化を細胞周期制御の観点から解析した。FACSを用いた解析から、アンドロゲン除去後、SC-3の増殖は24時間で細胞周期のG1期に停止することが分かった。アンドロゲン除去後、サイクリンD1はタンパクレベルでの発現は減少したが、この変化は細胞周期のG1期における停止よりも遅い48時間から72時間で認められた。また他の正の細胞周期制御因子サイクリンA, サイクリンE, サイクリン依存性キナーゼ(Cdk2, Cdk4)のタンパクレベルでの変化はなかった。一方、負の細胞周期制御因子であるサイクリン依存性キナーゼインヒビターではp27がmRNAレベル、タンパクレベルで共にテストステロン除去後24時間で上昇したが、p21は逆に減少した。以上の結果はアンドロゲン非存在下で早期より認められるp27発現の増加とCdk2との複合体形成の促進が、Cdk2活性の低下を介して、細胞周期をG1期に停止させたと考えられる。

p27は細胞をTGF- β で処理したりあるいは細胞に接触阻害を引き起こすと誘導される、サイクリンE/Cdk2複合体に対する阻害活性の本体としてクローニングされた⁶⁾ p27を細胞内で高発現させると、p21と同様に細胞はG1期で停止する。細胞内のp27タンパク量は細胞周期の進行に従い大きくは変化せず、比較的一定に保たれている。しかし、p27タンパク質の量はユビキチンプロテアソーム系によるタンパク質分解で調節されており、静止期の細胞では、増殖している細胞に比べてp27のユビキチン化活性が低いということがわかっている。このことから、p27はp21とは異なる制御系により細胞周期制御に関与している可能性も考えられる。最近p27の発現量と前立腺癌、乳癌の関係が研究され、p27の発現が高いと予後が良いとの結果が報告された⁷⁾ p27の発現量が低いことは腫瘍組織内でのp27の分解反応が高いことが示唆される⁸⁾ 前立腺癌の予後の悪さがホルモン療

法耐性にあることから, 前立腺癌組織内の p27 の発現量がホルモン依存性の指標になる可能性があると考えられる. また, p27 ノックアウトマウスの解析から, 前立腺肥大が発見されており, これはわれわれの仮説に一致するものと思われる⁹⁾.

正の細胞周期制御因子であるサイクリン D1 が同じホルモン依存性癌である乳癌の増殖に重要であり, 乳癌患者で増幅, 高発現が確認されている¹⁰⁾ サイクリン D1 を高発現させたトランスジェニックマウスの乳腺では過形成, 癌が発生している^{11,12)} また, サイクリン D1 がエストロゲン受容体の転写活性をホルモン非依存性に高めることは既に報告されている^{10,13)} 一方, アンドロゲン依存性癌細胞増殖の分子メカニズム, アンドロゲン受容体と細胞周期制御因子のシグナル伝達機構についてはあまり知られていない^{14,15)} これを元にわれわれは正の細胞周期制御因子とアンドロゲン受容体の転写活性との関係を解析した. その結果, サイクリン D1 はアンドロゲン受容体の転写を抑制したが, サイクリン E は活性化した. またサイクリン E はアンドロゲン受容体の転写調節領域に直接結合した¹⁶⁾

以上の結果から, 前立腺癌のアンドロゲン依存性増殖, ホルモン療法耐性獲得のメカニズムに正と負の細胞周期制御因子が密接に関与している可能性が示唆された.

今回はおもに G1 期に働くサイクリンと Cdk インヒビターについて解析したが, 今後さらに他の細胞周期制御因子についても検討する必要があると思われる.

結 語

前立腺癌のアンドロゲン依存性増殖メカニズムにおける細胞周期制御因子の変化を基礎的に検討した.

アンドロゲン依存性増殖抑制には p27 とサイクリン D1 が, またアンドロゲン受容体を介した転写調節にはサイクリン E が関与していることが示唆された.

最後に, 第49回日本泌尿器科学会中部総会会長である大阪大学泌尿器科奥山明彦教授には, 今回発表の機会をあたえていただきましたことにあらためて厚く御礼申し上げます.

文 献

- 1) Musgrove EA, Hamilton JA, Lee CSL, et al.: Growth factor, steroid, and steroid antagonist regulation of cyclin gene expression associated with changes in T-47D human breast cancer cell cycle progression. *Mol Cell Biol* **13**: 3577-3587, 1993
- 2) Morgan DO: Principles of CDK regulation. *Nature* **374**: 131-134, 1995
- 3) Sherr CJ and Roberts JM: Inhibitors of mammalian G1 cyclin-dependent kinases. *Genes & Dev* **9**: 1149-1163, 1995
- 4) Minesita T and Yamaguchi K: An androgen-dependent mouse mammary tumor. *Cancer Res* **7**: 1168-1175, 1965
- 5) Noguchi S, Nishizawa Y, Nakamura N, et al.: Growth-stimulating effect of pharmacological doses of estrogen on androgen-dependent Shionogi carcinoma 115 in vivo but not in cell culture. *Cancer Res* **47**: 263-268, 1987
- 6) Toyoshima H and Hunter T: p27, a novel inhibitor of G1 cyclin-Cdk protein kinase activity, is related to p21. *Cell* **78**: 67-74, 1994
- 7) Porter PL, Malone KE, Heagerty PJ, et al.: Expression of cell-cycle regulators p27^{Kip1} and cyclin E, alone and in combination, correlate with survival in young breast cancer patients. *Nat Med* **3**: 222-225, 1997
- 8) Loda M, Cukor B, Tam SW, et al.: Increased proteasome-dependent degradation of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27 in aggressive colorectal carcinomas. *Nat Med* **3**: 231-234, 1997
- 9) Nakayama K, Ishida N, Shirane M, et al.: Mice lacking p27 (Kip1) display increased body size, multiple organ hyperplasia, retinal dysplasia, and pituitary tumors. *Cell* **85**: 707-720, 1996
- 10) Buckley MF, Sweeney KJE, Hamilton JA, et al.: Expression and amplification of cyclin genes in human breast cancer. *Oncogene* **8**: 2127-2133, 1993
- 11) Wang TC, Cardiff RD, Zukerberg L, et al.: Mammary hyperplasia and carcinoma in MMTV-cyclin D1 transgenic mice. *Nature* **369**: 669-671, 1994
- 12) Sicinski P, Liu-Donaher J, Parker SB, et al.: Cyclin D1 provides a link between development and oncogenesis in the retina and breast. *Cell* **82**: 621-630, 1995
- 13) Zwijsen RM, Wientjens E, Klompmaier R, et al.: CDK-independent activation of estrogen receptor by cyclin D1. *Cell* **88**: 405-415, 1997
- 14) Lu S, Tsai SY and Tsai M-J: Regulation of androgen-dependent prostatic cancer cell growth: androgen regulation of CDK2, CDK4, and CKI p16 genes. *Cancer Res* **57**: 4511-4516, 1997
- 15) Menjo M, Kaneko Y, Ogata E, et al.: Critical role for p27 in cell cycle arrest after androgen depletion in mouse mammary carcinoma cells. *Oncogene* **17**: 2619-2627, 1998
- 16) Hashimoto Y, Yamamoto A, Kohri K, et al.: Cyclin E as a coactivator of the androgen receptor. *J Cell Biol* **150**: 873-880, 2000

(Received on March 1, 2000)

(Accepted on October 5, 2000)